

## INTRODUCTION

Les entérobactéries constituent une part importante des bactéries isolées lors du diagnostic bactériologique des infections humaines (**9, 25, 35**).

On les rencontre dans des prélèvements très divers, mais particulièrement dans les urines (**4, 16**) et les prélèvements sanguins, qui constituent une part importante de l'activité du laboratoire de bactériologie.

La famille des Enterobacteriaceae compte actuellement plus de 100 espèces bactériennes (**32, 41**). Mais, dans ces laboratoires ne sont isolées avec une certaine fréquence qu'une vingtaine d'espèces bactériennes qui peuvent présenter un intérêt médical, voire même être potentiellement pathogènes et qui doivent être identifiées correctement quels que soient les moyens techniques mis en oeuvre.

L'identification de ces bactéries bénéficie depuis de nombreuses années déjà de l'existence de plusieurs méthodes :

- ❖ les galeries classiques avec un nombre de caractères limité. Elles nécessitent parfois le recours d'autres tests biochimiques complémentaires.
- ❖ les galeries Api qui sont très performantes mais de coût élevé.

L'objectif de notre étude est de mettre au point une microméthode d'identification, adaptée à la routine et de coût bas.

Ce travail comprend essentiellement deux parties :

- ❑ La première partie est consacrée à une revue bibliographique relative aux généralités sur les entérobactéries.
- ❑ La deuxième partie est consacrée au travail personnel avec :
  - la mise au point et l'évaluation de la méthode
  - les résultats et commentaires
  - la discussion.

## GENERALITES

### I- DEFINITION (12, 16, 29).

La famille des Enterobacteriaceae est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison de leurs caractères bactériologiques communs :

- ce sont des bacilles à Gram négatif ;
- mobiles par une ciliature péritriche, ou immobiles ;
- se développant en aéro-anaerobiose et sur gelose nutritive ordinaire ;
- acidifiant le glucose par voie fermentative avec souvent production de gaz ;
- ne possédant pas d'oxydase ;
- possédant une catalase à l'exception des *Shigella dysenteriae* du sérotype 1
- réduisant les nitrates en nitrites à l'exception de certaines souches d'*Erwinia* et de très rares mutants.

Le contenu en G+C p.100 de leur ADN est échelonné de 39 à 59 moles p. 100. (16, 28, 29)

### II- CLASSIFICATION (7, 13, 14, 15, 16, 24, 29, 30).

La classification des entérobactéries a toujours fait l'objet de confusions, des progrès récents réalisés en taxonomie font que de nouvelles espèces sont constamment décrites.

La famille des Enterobacteriaceae comprend de nombreux genres et espèces dont la liste résumée ci-dessous, inspirée de **FARMER ET AL (15)** donne un aperçu. (**Tableau I**)

En 1993 **BRUCHEN ET AL (6)** du CDC d'Atlanta ont proposé une nouvelle classification où les espèces qui n'ont pas été suffisamment étudiées pour recevoir un nom d'espèce ou être rattachées à une espèce déjà existante sont désignés sous le nom d' "Enteric group " (**Tableau II**).

**Tableau I : Principaux genres et espèces de la famille des entérobactéries actuellement dénommés (29).**

<i>Buttiauxella</i>		<i>Leminorella</i>	<i>Serratia</i>
<i>B. agrestis</i> *	<i>Escherichia-Shigella</i>	<i>L. grimonii</i> *	<i>S. marcescens</i> *
<i>Cedecea</i>	<i>E. coli</i> *	<i>L. richardii</i> *	<i>S. liquefaciens</i> *
<i>C. davisae</i> *	<i>Shigella</i> *		<i>S. rubidaea</i> *
<i>C. lapagei</i> *	<i>E. fergusonii</i> *	<i>Moellerella</i>	<i>S. odorifera</i> *
<i>C. neteri</i> *	<i>E. hermannii</i> *	<i>M. wisconsensis</i>	<i>S. plymuthica</i> *
	<i>E. vulneris</i> *		<i>S. ficaria</i> *
	<i>E. blattae</i>	<i>Obesumbacterium</i>	
<i>Citrobacter</i>		<i>O. proteus</i>	
<i>C. freundii</i> *	<i>Ewingella</i>		<i>Tatumella</i>
<i>C. diversus</i> *	<i>E. americana</i> *	<i>Proteus</i>	<i>T. ptyseos</i> *
<i>C. amalonaticus</i> *		<i>P. mirabilis</i> *	
	<i>Hafnia</i>	<i>P. vulgaris</i> *	<i>Xenor</i>
<i>Edwardsiella</i>	<i>H. alvei</i> *	<i>P. morganii</i> *	<i>X. luminescens</i>
<i>E. tarda</i> *		<i>P. rettgerii</i> *	<i>X. nematophilus</i>
<i>E. hoshinae</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>P. penneri</i> *	
<i>E. ictaluri</i>	<i>K. pneumoniae</i> *	<i>P. myxofaciens</i>	<i>Yersinia</i>
	<i>K. oxytoca</i> *		<i>Y. enterocolitica</i> *
<i>Enterobacter</i>	<i>K. planticola</i> *		<i>Y. frederiksenii</i> *
<i>E. aerogenes</i> *	<i>K. ozaenae</i> *	<i>Providencia</i>	<i>Y. intermedia</i> *
<i>E. cloacae</i> *	<i>K. rhinoscleromatis</i> *	<i>P. stuartii</i> *	<i>Y. kristensenii</i> *
<i>E. asburiae</i>	<i>K. terrigena</i>	<i>P. alcalifaciens</i> *	<i>Y. pestis</i> *
<i>E. agglomerans</i> *		<i>P. rustigianii</i> *	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
<i>E. gergoviae</i> *	<i>Kluyvera</i>		
<i>E. sakazakii</i> *	<i>K. ascorbata</i> *	<i>Rhanella</i>	<i>Yokenella</i>
<i>E. taylorae</i> *	<i>K. cryocrescens</i> *	<i>R. aquatilis</i> *	<i>Y. regensburgi</i> *
<i>E. amnigenus</i> *			
<i>E. intermedium</i>	<i>Koserella</i>	<i>Salmonella</i>	
	<i>K. trabulsii</i> *	<i>S. enterica</i>	

\* *Ont été isolées de prélèvements d'origine humaine*

**Tableau II : Classification des entérobactéries selon BRUCHEN ET COLL (6)**

NOM COURANT	SYNONYME	NOM COURANT	SYNONYME
<i>Cedecae davisae</i>	Enteric group 15	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Cedecae lapagei</i>		<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Cedecae neteri</i>	Cedecae species 4	<i>Proteus penneri</i>	<i>Proteus vulgaris</i> indole positive
<i>Cedecae species 3</i>		<i>Proteus vulgaris</i>	
<i>Cedecae species 5</i>		<i>Providencia alcalificiens</i>	<i>Proteus inconstans</i>
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Levinea amalonatica</i>	<i>Providencia rettgerii</i>	<i>Proteus rettgerii</i>
<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Providencia rustigianii</i>	<i>P. alcalificiens</i> biogroup 3
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Colobactrum freundii</i>	<i>Providencia stuartii</i>	
<i>Edwardsiella tarda</i>		<i>Rahnella aquatilis</i>	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Salmonella</i> subgroup 1 serotypes	<i>Salmonella choleraesuis</i>
<i>Enterobacter amnigenus</i>			<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Enterobacter asburiae</i>	Enteric group 17		<i>Salmonella gallinarum</i>
<i>Enterobacter cloacea</i>			<i>Salmonella paratyphi</i>
<i>Enterobacter gergoviae</i>			<i>Salmonella pullorum</i>
<i>Enterobacter hormaechi</i>			<i>Salmonella typhi</i>
<i>Enterobacter hormaechi</i>	Enteric group 75	<i>Salmonella</i> subgroup 2	
<i>Enterobacter sakazakii</i>		<i>Salmonella</i> subgroup 3a	
<i>Enterobacter taylorae</i>	Enteric group 19	<i>Salmonella</i> subgroup 3b	
<i>Escherichia coli</i>		<i>Salmonella</i> subgroup 4	
<i>Escherichia fergusonii</i>	Enteric group 10	<i>Salmonella</i> subgroup 5	
<i>Escherichia hermannii</i>		<i>Serratia ficaria</i>	
<i>Escherichia vulneris</i>		<i>Serratia fonticola</i>	
<i>Ewingella americana</i>		<i>Serratia grimesii</i>	
<i>Hafnia alvei</i>		<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Enterobacter liquefaciens</i>
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i> ornithine positive	<i>Serratia marcescens</i>	
<i>Klebsiella oxytoca</i>		<i>Serratia odorifera</i>	
<i>Klebsiella ozaenae</i>		<i>Serratia plymuthica</i>	
<i>Klebsiella planticola</i>		<i>Serratia proteamaculans</i> spp.	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>quinovora</i>	
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>		<i>Serratia rubidaea</i>	
<i>Kluyvera ascorbata</i>		<i>Shigella boydii</i>	<i>Shigella</i> biogroup C
<i>Kluyvera cryocrescens</i>		<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella</i> biogroup A
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Escherichia adecarboxylata</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Shigella</i> biogroup B
<i>Leminorella grimontii</i>	Enteric group 57	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Shigella</i> biogroup D
<i>Leminorella richardii</i>		<i>Tatumella ptyseos</i>	CDC group E 9
<i>Moellerella wisconsinensis</i>	Enteric group 46	<i>Trabulsiella guamensis</i>	Enteric group 90
<i>Morganella morganii</i> ssp. <i>morganii</i>	<i>Proteus morganii</i>	<i>Yersinia bercovieri</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> biogroup 3a
<i>Morganella morganii</i> ssp. <i>sibonii</i>	<i>Proteus morganii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Pasteurella enterocolitica</i>
		<i>Yersinia frederiksenii</i>	
		<i>Yersinia intermedia</i>	
		<i>Yersinia kristensenii</i>	
		<i>Yersinia mollaretii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> biogroup 3b
		<i>Yersinia pestis</i>	<i>Pasteurella pestis</i>
		<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Pasteurella pseudotuberculosis</i>
		<i>Yersinia rohdei</i>	
		<i>Yokenella regensburgei</i>	<i>Koserella trabulsi</i>

### III- HABITAT

Le nom d'entérobactéries a été donné parce que ces bactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et des animaux.

Les entérobactéries sont largement retrouvées au niveau des plantes, dans l'eau et le sol (29,43).

Quelques espèces ont une écologie très limitée.

*Salmonella typhi* donne la fièvre typhoïde et est seulement retrouvé chez l'homme (14, 20, 24). Par contre les souches de *Klebsiella pneumoniae* sont largement retrouvées dans l'environnement (33).

### IV- POUVOIR PATHOGENE NATUREL.

Sur le plan de la pathologie humaine, il convient de distinguer :

- ❖ les espèces pathogènes spécifiques.
- ❖ Les espèces pathogènes opportunistes.

#### IV-1- Bactéries pathogènes spécifiques (BPS).

Nous les retrouvons à l'état commensal (en dehors des porteurs sains) et dont la présence dans les milieux extérieurs n'est qu'un phénomène transitoire. Les maladies qu'elles engendrent sont dues à un défaut d'hygiène et la contamination se produit soit par contact direct, soit par l'intermédiaire d'un vecteur (alimentaire ou animal); citons les *Salmonella*, les *Shigella* et les *Yersinia*.

#### IV-2- Bactéries pathogènes opportunistes (BPO).

Ces bactéries peuvent provenir de la flore digestive commensale normalement résidente.

Les infections qu'elles peuvent engendrer ont pour origine :

- soit par un point de départ endogène, ce qui s'explique par leur commensalité
- soit par un point de départ exogène. Il convient alors de distinguer deux aspects :
  - \* l'un est rencontré dans l'hospitalisme infectieux où un défaut d'asepsie permettra la transmission à partir d'un milieu contaminé ou d'un malade par instrumentation ou voie manuportée ;
  - \* l'autre s'explique par le fait que ces bactéries de la flore digestive peuvent se retrouver par élimination dans la nature à l'état transitoire.

Si elles n'engendrent généralement pas d'infection, elles sont cependant le signe d'une contamination fécale, voire un défaut d'hygiène

## V- CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

### V-1 - Morphologie (29)

On ne peut donner que des moyennes pour les dimensions qui varient selon l'âge de la culture, l'espèce et la souche. Nous avons :

- les entérobactéries de type coliformes, ayant 2 à 6  $\mu\text{m}$  de long et 1 à 1,5  $\mu\text{m}$  de large; il s'agit de *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Entérobacter*, *Citrobacter*.
- les entérobactéries de longueur moyenne ou courte, ayant 1 à 3  $\mu\text{m}$  de long et 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de largeur; il s'agit de *Salmonella*, *Shigella*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*.
- les entérobactéries de type parvobactéries se présentant sous forme de coccobacille; il s'agit essentiellement de *Yersinia*.

Certains genres ou espèces de la famille ne contiennent que des bacilles immobiles : *Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*.

La plupart des bactéries classées dans les autres genres sont au contraire mobiles.

### **V-2- Caractères culturels (12).**

Les entérobactéries se développent bien dans un bouillon ou sur une gélose ordinaire incubée 18 heures à 37°C.

- Les formes S (Smooth) sont l'aspect habituel au sortir de l'organisme.

Les colonies sont lisses, bombées, brillantes et humides, elles ont 2 à 4 mm de diamètre.

Le bouillon est trouble de façon homogène.

- Les formes R (Rough) s'observent surtout avec des souches ayant subi plusieurs repiquages.

Les colonies sont rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte mate. En bouillon, les formes R donnent un aspect grumeleux.

- Les colonies muqueuses sont habituelles avec les *Klebsiella*. Leur diamètre peut dépasser 10 mm ; elles ont une tendance à la confluence.

On peut les rencontrer aussi dans d'autres espèces, notamment *Salmonella paratyphi B*.

- Les colonies naines s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques ; elles ne sont pas exceptionnelles chez les souches d'*Escherichia coli* isolés d'infections urinaires.

### **V-3- Caractères biochimiques et métaboliques**

C'est sur l'étude de ces caractères que repose en pratique le diagnostic de genre et d'espèce qui ne doit être abordé qu'après que le diagnostic de famille ait été établi avec certitude.



Les caractères biochimiques et métaboliques étudiés sont :

### **V-3-1 - Etude de l'utilisation des glucides**

\* Milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides (MEVAG).

Ce sont des géloses molles en culot contenant un indicateur de pH et un sucre. L'utilisation du sucre est mise en évidence par une acidification du milieu conduisant à un changement de coloration (virage de l'indicateur). Le milieu de base est le milieu de Hugh et Leifson.

\* Eau peptonnée additionnée de sucre.

Comme pour le milieu MEVAG, il y'a acidification du milieu et virage de l'indicateur de pH si le sucre est métabolisé. Le milieu est constitué par l'eau peptonnée additionnée de sucre à la concentration finale de 0.5 %. L'indicateur de pH peut être le rouge de phénol ou le bleu de bromothymol à la concentration finale de 0.2%.

### **V-3-2- Etude de la production de $\text{SH}_2$ (hydrogène sulfuré).**

Les micro-organismes peuvent produire des sulfures ( $\text{S}^{2-}$  qui selon le pH du milieu peut donner l'ion hydrogènesulfure  $\text{SH}^-$  ou l'hydrogène sulfuré) par deux processus différents :

- le catabolisme des acides aminés soufrés essentiellement la désulfhydratation de la cystéine.
- la réduction des composés minéraux soufrés : sulfates, sulfites et surtout thiosulfates conduit à la formation de sulfures.

Les milieux utilisés ne doivent pas contenir d'acides aminés soufrés. ce processus est celui utilisé pour l'identification des Entérobactéries.

La mise en évidence des sulfures se fera par incorporation de fer ou plomb dans le milieu.

Il se forme un précipité noir de sulfure de fer ou de plomb.

### **V-3-3 - Recherche de l'uréase. (figure 1)**

L'uréase est une enzyme hydrolysant l'urée. La réaction catalysée par l'uréase peut être écrite de plusieurs façons.

La réaction (1) rend compte de la production de deux moles d'ammoniac qui alcalinisent le milieu selon la réaction (2)

Mais le  $\text{CO}_2$  est un acide comme le montre la réaction (3).

Toutefois la quantité supérieure d'ammoniac, sa meilleure solubilité conduisent à l'alcalinisation qui peut être écrite selon la formule (4) plus compatible avec les conditions du pH du milieu.

L'hydrogencarbonate produit peut libérer un  $\text{H}^+$  supplémentaire pour donner un ion carbonate.

Il faut une uréase particulièrement forte pour obtenir cet ion. Dans ce cas la réaction globale pourrait s'écrire ainsi : (5)

Cette écriture ne rend pas compte de façon claire de l'alcalinisation, un acide (ion ammonium) et une dibase (ion carbonate) devant se neutraliser réciproquement .

Techniquement, le résultat observé est une alcalinisation appréciée par le virage de l'indicateur de pH qui est le rouge de phénol.

### **V-3-4- Mise en évidence de la production d'Indole.**

Certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à une tryptophanase. Il se forme de l'Indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac.

L'indole est apolaire, donc plutôt soluble dans les solvants organiques, et réagit fortement avec le para diméthylamino-benzaldéhyde en milieu acide.

### V-3-5 - Recherche des Décarboxylases

#### V-3-5-1- Principe

Il repose sur l'alcalinisation du milieu de culture par le produit ou les produits formés.

Elle est mesurée par la variation de la teinte de l'indicateur de pH (Bromocresol pourpre).

Cette alcalinisation est due :

- à l'apparition de produits particulièrement alcalins ( Cadaverine pour la LDC, Putrescine pour l'ODC et Ornithine pour l'ADH).
- à la disparition de la fonction carboxylique de l'acide aminé sous forme de CO<sub>2</sub> de moindre acidité et volatil.

#### V-3-5-2- Réactions catalysées (figure 2 et 3)

- Lysine décarboxylase (LDC)
- Ornithine décarboxylase (ODC)
- Arginine dihydrolase (ADH)

### V-3-6- Recherche des désaminases (figure 4)

La réaction générale catalysée par ces enzymes est la suivante : (1)

Les électrons libérés sont captés par un coenzyme de transport généralement le NAD<sup>+</sup>.

Il s'agit donc d'une désamination oxydative dont le mécanisme se décompose en deux étapes.

- **1ère étape** : oxydation de l'acide-aminé en acide-iminé/
- **2ème étape** : hydrolyse de l'acide-iminé en acide cétonique/

Le radical R varie avec l'acide aminé : en bactériologie il s'agit en général du tryptophane, de la phenyl alanine ou de la lysine.

- Tryptophane Désaminase (TDA)
- Phenyl Alanine Désaminase (PDA)
- Lysine Désaminase (LDA)

### **V-3-7- Utilisation du citrate de Simmons**

Le milieu au citrate de Simmons permet de voir si la bactérie est capable de pousser en présence de citrate comme seule source de carbone notons que le citrate est le premier composé du cycle de Krebs ; s'il est utilisé, il ya croissance et le milieu s'alcalinise.

Il est important d'ensemencer ce milieu à partir d'un milieu gélosé pour éviter d'apporter des substances nutritives au milieu synthétique que constitue le citrate de Simmons.

### **V-3-8 - Utilisation du Malonate**

Le Malonate est un inhibiteur de la succinate dehydrogenase du cycle de Krebs. Si le malonate est utilisé, le cycle de Krebs reprend et le milieu s'alcalinise.

### **V-3-9- Test au Rouge de Méthyle (RM)**

Le test permet de préciser l'évolution du pH en milieu glucosé. Les acides produits par les micro-organismes sont de deux ordres :

- du CO<sub>2</sub> acide faible et volatil
- des acides organiques plus ou moins forts : ac. succinique, malique, etc...

Les bactéries RM<sup>+</sup> sont des bactéries produisant des acides organiques relativement forts. Et les bactéries RM<sup>-</sup> produisent des acides organiques relativement faibles et plutôt du CO<sub>2</sub>.

### **V-3-10- Réaction de Voges Proskauer (VP).**

On étudie la formation d'un produit du métabolisme du glucose, l'acétyl methyl carbinol ou acétoïne. En présence d'une base forte, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné (oxydation en diacétyl).

### **V-3-11- Test à l'ONPG.**

ONPG = ortho nitrophenyl  $\beta$ -D Galactopyranoside

Il met en évidence la présence de  $\beta$  Galactosidase qui scinde le lactose en glucose et galactose.

L'ONPG en présence de  $\beta$  Galactosidase donne l'ortho nitrophénol (jaune) et le galactose

### **V-3-12- Recherche de la Nitrate Réductase**

L'étude de la réduction des nitrates se fera par la mise en évidence des nitrites formés.

Ces derniers en milieu acétique ou sulfurique donnent une coloration rose en présence d'acide sulfanilique et d' $\alpha$  naphtylamine (Réaction de Griess).

Toutefois certaines bactéries réduisent les nitrates au-delà du stade "nitrites", en conséquence toute réaction ne révélant pas nitrites doit être complétée par l'épreuve de Zo Bell, épreuve qui consiste à ajouter un peu de zinc au milieu.

## **V-4- Caractères antigéniques (12).**

### **V-4-1 - Antigène commun ou de KUNIN**

Cet antigène n'est pratiquement retrouvé que dans cette famille et à un intérêt taxonomique.

### **V-4-2- Antigène O.**

Ce sont des antigènes de paroi constitués de lipopolysaccharides (LPS) qui sont thermostables et résistent à l'alcool ou à l'acide.

Les réactions d'agglutination où ils interviennent se produisent lentement, sont constituées d'agglutinants granulaires, difficilement dissociables par agitation.

#### **V-4-3- Antigène H.**

Ce sont des antigènes flagellaires qui ne sont donc présents que chez les souches mobiles.

Ils sont constitués d'une protéine ; la flagelline ; ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool.

Les réactions d'agglutination où ils interviennent se produisent rapidement, sont constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation.

#### **V-4-4 - Antigène K**

Ces antigènes capsulaires sont généralement constitués d'une couche externe polysaccharidique.

Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes L,A,B des *E coli* et l'antigène Vi de certaines *Salmonella* ou *Citrobacter*.

Ils sont détruits par une ébullition de deux heures .

Les antigènes d'adhérence ou adhésines, de nature protéique, en relation avec la présence de pili sont classés parmi les antigènes K (K88, K99).

### **VI- Méthodes d'identification biochimique(23, 35, 38, 39, 40)**

#### **VI - 1 - Mini-galerie d'identification (8)**

L'identification repose sur l'utilisation des milieux suivants:

- milieu de Kligler - Hajna ( fermentation du glucose et du lactose, production de SH<sub>2</sub> et de gaz, test à l'ONPG )

- milieu mannitol - mobilité - nitrate ( fermentation du mannitol, envahissement par les bactéries mobiles, réduction des nitrates en nitrites )
- milieu urée - indole ( uréase, TDA, indole )
- milieu citrate de Simmons

Pour l'identification de quelques espèces, les caractères indiqués ci-dessous peuvent être complétés par :

- L' étude du profil des décarboxylases ( LDC, ODC, ADH, )
- La réaction de Voges Proskauer : VP (voie métabolique particulière : production d' acétoïne à partir du glucose )

Les principaux caractères biochimiques différentiels des genres et espèces le plus fréquemment rencontrés chez l' homme sont donnés par le tableau III (29)

**Tableau III : Principaux caractères biochimiques différentiels des genres et espèces le plus fréquemment rencontrés chez l'homme(29).**

	MOB	LAC	ONPG	SH2	LDC	ODC	ADH	URE E	TDA PDA	IND	CS	MAL	VP	TTR	GEL	GAZ- GLU	MAN	RHA	SAC	ARA	INO	ADO	GAL	DNase
<i>Salmonella</i> <sup>(1)</sup>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	<b>d</b>	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	<b>+/x</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	<b>d</b>	+	-	-	+	-
<i>Levinea</i>	+	-	+	-		+	<b>d</b>	-	-	+	+	<b>d</b>	-	<b>d</b>	-	+	+	+	<b>d</b>	+	-	<b>d</b>	+	-
<i>Escherichia coli</i>	+	<b>+/x</b>	+	-	<b>d</b>	<b>d</b>	<b>d</b>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	<b>d</b>	<b>d</b>	<b>d</b>	+	-	-	+	-
<i>Shigella</i>	-	-	<b>d</b>	-	-	<b>d</b>	<b>d</b>	-	-	<b>d</b>	-	-	-	-	-	-	<b>d</b>	<b>d</b>	-	<b>d</b>	-	-	<b>d</b>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	-	+	-	-	(+)	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>enterobacter cloacea</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<b>d</b>	<b>d</b>	+	-
<i>Hafnia alvei</i>	<b>+</b> *	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<b>d</b> *	<b>d</b>	<b>+</b> *	<b>d</b>	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	<b>d</b>	+	-	-	-	+	-	<b>d</b>	<b>d</b>	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	<b>d</b>	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	<b>d</b>	-	<b>d</b>	+	+	+	-	-	<b>d</b>	-	-	-	-	-
<i>Proteus morganii</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	<b>d</b>	-	-	-	-	-
<i>Proteus rettgerii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	<b>d</b>	<b>d</b>	<b>d</b>	-	-	+	+	-	-
<i>Providencia</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	<b>d</b>	-	-	<b>d</b>	-	<b>d</b>	<b>d</b>	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<b>+</b> *	-	<b>+</b> *	-	-	+	-	+	-	<b>d</b>	-	-	<b>d</b> *	<b>d</b>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<b>+</b> *	-	<b>+</b> *	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	<b>d</b>	-	-	<b>d</b>	-

Sauf pour les méthodes rapides (test ONPG, uréase, désaminases)

+ : positif en 1 à 2 jours

- : négatif

**d** : différents types biochimiques

**+**\* et **d**\* : positif à 22°C, négatif à 37°C

Méthodes rapides :

+ : positif en 1 à 2 heures

- : négatif en 24 heures

(1) : *Salmonella* sous-espèces I. Exceptions importantes

S.I ser. typhi : LDC+ ; ODC- ; citrate- ; gaz - ; SH2 x

S.I ser. paratyphiA : LDC- ; ODC+ ; citrate- ; gaz +- ; SH2 -



## VI - 2 - Identification par galerie API ( 19, 36 )

### VI - 2 - 1 Api 20 E ( Entérobactériaceae ) (1, 2, 11, 22)

Le système Api 20 E est constitué d'une galerie de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés; la suspension bactérienne répartie dans les tubes dissout les substrats.

Les métabolites produits sont mis en évidence par des réactions colorées ou par addition de réactifs après 24 à 48 heures d' incubation à 35 - 37° C

La composition de la galerie est donnée par le tableau IV

**Tableau IV : Composition de la galerie Api 20E.**

<b><u>TESTS</u></b>	<b><u>SUBSTRATS</u></b>
ONPG	O. Nitrophenyl B.D galactopyranoside
ADH	Arginine
LDC	Lysine
ODC	Ornithine
CIT	Citrate de sodium
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium
URE	Urée
TDA	Tryptophane
IND	Tryptophane
VP	Pyruvate de sodium
GEL	Gelatine
GLU	Glucose
MAN	Mannitol
INO	Inositol
SOR	Sorbitol
RHA	Rhamnose
SAC	Saccharose
MEL	Melibiose
AMY	Amygdaline
ARA	Arabinose

## **VI - 2 - 2 - Api Rapid 20E**

Les galeries Rapid 20 E sont constituées de 20 microtubes contenant des substrats deshydratés, destinés à la mise en évidence d' activités enzymatiques et de fermentations sucrées ; le temps d' incubation est de 4 Heures.

La lecture se fait à l'oeil nu, éventuellement après addition d'un ou de plusieurs réactif (s) et conduit à l'établissement d'un code d' identification.

## **VI -- 2 - 3 - Galerie ATB 32 GN (10, 19, 44)**

Les galeries ATB 32 GN sont basées sur l'assimilation de 32 substrats carbonés répartis dans autant de cupules. L'incubation se fait 24 H à 30° C, en chambre humide hermétique.

La lecture et l'interprétation des galeries ATB 32 GN sont faites automatiquement par le lecteur ATB 1510 et l'analyseur de données ATB 1530.

## **VI - 2 - 4 - MIS Enterobacteriaceae 18 H (13, 15)**

MIS Enterobacteriaceae 18H est un nouveau système d'identification des enterobactéries sur microplaques.

Par cette méthode, l'identification repose sur la réalisation de 21 réactions biochimiques :

- Production d'indole
- Production d'H<sub>2</sub>S
- Réaction de Voges Proskauer
- hydrolyse de l'esculine
- Mise en évidence d'enzymes : uréase, tryptophane désaminase (TDA), décarboxylases (LDC, ODC), arginine dihydrolase (ADH), glucosidases :  $\beta$  galactosidase (ONPG),  $\beta$  glucuronidase (PGUR),
- - Utilisation de substances comme seule source de carbone (citrate, malonate)

- Fermentation de glucides (glucose, rhamnose, saccharose, adonitol, inositol, xylose, sorbitol)

Quatre cupules contrôles sont prévues.

La lecture est effectuée au photomètre programmé ou réglé à différentes longueurs d'onde.

## **MATERIEL ET METHODES**

### **I- MISE AU POINT DE LA METHODE**

#### **I-1- Milieux liquides**

##### **I-1-1- Matériel**

- Agitateur magnétique
- Balance de précision
- pH mètre
- Seringue
- Filtres de 0,2 µl de diamètre
- Micropipette
- Embouts stériles
- Flacons en verre avec bouchon à vis de 50, 100 et 150 ml
- Tubes stériles
- Cryotubes
- Erlen Meyer
- Papier emballage
- Mortier

##### **I-1-2- Réactifs**

- glucides : glucose, mannitol, Inositol, lactose, sorbitol, saccharose
- bleu de bromothymol, peptone bactériologique, peptone tryptique, rouge de phénol.
- chlorure de sodium
- soude
- bouillon nutritif
- L tryptophane, L lysine, L arginine, L ornithine, L phenyl alanine
- phosphate monopotassique et dipotassique
- citrate trisodique, malonate de sodium
- urée
- alcool 95°
- extrait de levure
- sulfate d'ammonium
- sulfate de magnesium

- phosphate d'ammonium
- thiosulfate de sodium
- sous acetate de plomb
- nitrate de potassium
- poudre d'ONPG , tampon phosphate.

### **I-1-3- Concentration des milieux**

Les milieux solides sont rendus liquides en enlevant dans leurs formules la quantité d'agar. Pour les milieux liquides nous avons maintenu les mêmes formules.

Trois lots de milieux, de concentration différentes ont été préparés :  
le premier lot est de concentration normale.

le deuxième lot est de deux fois plus concentrée c'est à dire que pour chaque formule, les quantités en g/l sont multipliées par deux et pour le même volume d'eau.

le troisième lot est trois fois plus concentré.

Une fois préparés, les milieux sont testés avec le même inoculum plusieurs fois afin de savoir la meilleure concentration. Nous avons les meilleurs résultats avec les milieux deux fois concentrés.

### **I-1-4- Préparation des milieux de culture (deux fois concentrés)**

#### **1- Milieu pour l'utilisation des glucides**

- eau peptonée
- bleu de bromothymol
- glucides
- pH 7,4 - 7,5

\* Préparation de l'eau peptonée

Peptone tryptique.....	3 g
NaCl.....	1 g
Eau distillée.....	100 g

Les poudres sont dissoutes à chaud et le pH ajusté à 7,4. Le milieu est ensuite réparti dans un flacon et autoclavé pendant 20 mn à 120°C

\* Préparation du bleu de bromothymol (formule de KAUFFMAN)

bleu de bromothymol.....0,2 g  
soude 0,1 N..... 5 ml  
eau distillée.....95 ml

Broyer dans un mortier 0,2 g de l'indicateur dans 5 ml de soude 0,1 N  
Ajouter progressivement l'eau distillée.  
Autoclaver pendant 10 mn à 110 °C  
Ajouter le bleu de bromothymol pour : 2-8 ml/100 ml de milieu

Le milieu ainsi préparé (eau peptoné + indicateur) est repartitionné stérilement dans des tubes.

\* Adjonction des glucides dans le milieu

Les sucres sont ajoutés à la concentration de 2% dans le milieu.

En appliquant la formule ci-dessous, on détermine le volume de glucides à ajouter dans le milieu

$$V_g = v \frac{C_f}{C_g}$$

$V_g$  = volume de glucide à ajouté

$V$  = volume du milieu

$C_f$  = concentration finale du milieu en glucide

$C_g$  = concentration du glucide

Nous avons donc :

glucose 30 %.....2 ml/30 ml de milieu  
mannitol 20 %.....2 ml/20 ml de milieu  
lactose 25 %.....2 ml/25 ml de milieu  
inositol 5 % .....2 ml/5 ml de milieu  
saccharose 30 %.....2 ml/30 ml de milieu  
sorbitol 10 %.....2 ml/10 ml de milieu

## **2- Milieu pour la recherche de SH<sub>2</sub>**

\* Préparation du bouillon nutritif

Peptone .....5 g/l  
Extrait de viande..3 g/l  
pH = 7

Mettre 1,6 g de milieu sec dans 100 ml d'eau distillée. Mélanger soigneusement jusqu'à dissolution complète. Répartir puis stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 mn.

\* Adjonction des autres constituants :

- thiosulfate de sodium à 10 % : une goutte pour 5 ml de bouillon nutritif.
- Sous acétate de plomb au 1/1000 : 4 gouttes pour 5 ml de bouillon nutritif.

## **3- Milieu pour la recherche de l'uréase**

- L tryptophane..... 0,6 g
- phosphate monopotassique..... 0,2 g
- phosphate dipotassique.....0,2 g
- chlorure de sodium.....1 g
- urée..... 4 g
- alcool 95°..... 2 ml
- rouge de phénol ..... 0,5ml
- Eau distillée .....100 ml

La stérilisation se fait par filtration sur membrane

## **4- Milieu pour la recherche des décarboxylases**

Milieu de Falkow

- Extrait de levure ..... 0,6 g/100 ml
- glucose ..... 0,2 g/100 ml
- chlorure de sodium ..... 1 g/ 100 ml
- Bromocresol pourpre..... 0,2 ml

Prévoir 3 lots auxquels on ajoute respectivement :

- 1 % de L lysine
  - 1 % de L arginine
  - 1 % de L ornithine
- pH = 6,3 - 6,4 . Stérilisation 120°C pendant 15 mn  
répartir dans des tubes

### **5- Milieu pour la recherche de l'indole**

Pour cette recherche, nous avons comparé 2 milieux

- le milieu urée indole
- eau peptonée exempte d'indole

Ce dernier a donné une réaction plus nette à lire.

Sa formule est la suivante:

- Peptone bactériologique ..... 2 g
  - Chlorure de sodium.....1 g
  - Eau distillée ..... 100 ml
- Les poudres sont dissoutes à chaud ; le pH ajusté à 7,2  
Stérilisation à 120°C pendant 15 mn

### **6- Milieu au citrate de simmons**

- Chlorure de sodium ..... 10 g/l
  - Sulfate de magnésium ..... 0,4 g/l
  - Phosphate d'ammonium..... 2 g/l
  - Citrate trisodique..... 4 g/l
  - Bleu de bromothymol ..... 0,16 g/l
  - pH = 7
- Stérilisation à 120°C pendant 20 mn

Les poudres sont dissoutes à chaud, sauf le bleu de bromothymol qui sera dissout à part dans un peu d'eau avant d'être ajouté. Si on dissout toutes les poudres en même temps , l'indicateur va flotter au dessus du milieu.



**7- Milieu pour l'utilisation du malonate**

- Extrait de levure..... 2 g/l
- Malonate de sodium..... 6 g/l
- Glucose.....0,5 g/l
- Chlorure de sodium..... 4 g/l
- Sulfate de magnésium..... 4 g/l
- Phosphate dipotasique.....1,2 g/l
- Bleu de bromothymol.....0,05 g/l

pH = 7

Stérilisation à 120°C pendant 20 mn

Comme précédemment l'indicateur sera ajouté après la dissolution des autres constituants

**8- Milieu pour le test au rouge de méthyle et la réaction de Voges Proskauer**

- Peptone tryptique..... 20 g/l
- Phosphate dipotassique..... 4 g/l
- Glucose.....20 g/l

pH = 7,5

Stérilisation à 120°C pendant 20 mn

**9- Milieu pour la recherche de la phényl alanine désaminase (PDA)**

- L phényl alanine ..... 2 g/l
- ou D-L phényl alanine .....4 g/l
- Extrait de levure ..... 6 g/l
- Chlorure de sodium..... 10 g/l
- Phosphate dipotassique..... 2 g/l

pH = 7,3

Stérilisation à 120°C pendant 15 mn

Dissoudre à chaud les poudres

## **10- Milieu pour la recherche de la nitrate réductase**

C'est un bouillon nutritif additionné de nitrate (2 %)

\* Formule du bouillon nutritif

- Peptone..... 5 g/l

- Extrait de viande..... 3 g/l

pH = 7

\* Mettre 1,6 g du milieu sec (bouillon nutritif) et 2 g de nitrate de sodium dans 100 ml d'eau distillée. Mélanger jusqu'à dissolution complète à chaud. Répartir puis stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 mn.

## **11- Milieu à l'ONPG**

Dissoudre 80 mg d'ONPG dans 15 ml d'eau distillée portée à 50°C.

Laisser refroidir, ajouter 5 ml de solution tampon phosphate à pH 7.

Conserver à 4°C. Avant l'emploi, laisser le réactif quelques minutes à 37°C pour remettre le phosphate en solution.

### **I-1-5 -Ensemencement**

Répartir dans chaque microtube 50 µl de milieu et 50 µl d'une suspension bactérienne d'opacité correspondant au point 0,5 de l'échelle de Mac Farland. Recouvrir d'huile de paraffine les microtubes où sont recherchés la production de l'hydrogène sulfureux, les fermentations des glucides, la recherche de l'uréase et des décarboxylases.

Les microplaques sont ensuite recouvertes d'un film adhésif et incubées à 37 °C sur un support humide (papier buvard imbibés d'eau) pour éviter la déhydratation

Au bout de 18 H d'incubation, on peut faire la lecture

## **I-2- Milieux deshydratés**

### **I-2-1 Matériel**

- Etuve stérile munie d'un thermomètre
- microplaques constituées de 20 et 96 puits
- embouts stériles
- micropipettes
- dessicateur (gomme arabique)
- plastique pour emballage
- film adhésif

### **I-2-2- Concentration des milieux**

Nous avons préparé des milieux 2, 10 et 15 fois concentrés. Ces milieux sont répartis dans des plaques et déshydratés. Avec un même inoculum, nous avonsensemencé les plaques.

Pour les milieux 10 fois et 15 fois concentrés, les décarboxylases n'ont pas donnés de bons résultats. Le témoin ne vire pas au jaune.

Seul les milieux 2 fois concentrés ont donné des résultats corrects.

### **I-2-3- Température de déshydratation**

Les milieux liquides sont répartis dans la microplaque qui est ensuite portée des températures différentes (37°C, 40°C et 42°C) en présence de dessicateur.

A 37°C il faut 48H pour la deshydratation

A 40°C il faut au moins 24H

A 42°C il faut 18H

### **I-2-4- Temps de déshydratation**

A 42°C les plaques sont deshydratées en moins de 18 H en présence de dessicateur.

## II - EVALUATION DE LA METHODE

### II.1. Souches bactériennes

102 souches d'entérobactéries isolées de prélèvements d'origines variée ont été étudiées. Leur répartition par genre et espèce bactérienne est fourni par le tableau V.

**Tableau V :Echantillonnage des 102 souches d'entérobactéries étudiées**

<b>Entérobactéries souches</b>	<b>Nombre de</b>
Citrobacter amalonaticus	2
Citrobacter freundii	2
Citrobacter malonaticus	6
Escherichia coli	30
Klebsiella oxytoca	5
Klebsiella pneumoniae	10
Morganella morganii	2
Proteus mirabilis	4
Proteus vulgaris	1
Providencia stuartii	5
Salmonella typhi	8
Shigella boydii	5
Shigella dysenteriae A1	5
Shigella flexneri	5
Shigella sonnei	5
Entérobacter cloacae	4
Entérobacter aerogenes	2
Providencia rettgerii	1

---

<b>Total</b>	<b>102</b>
--------------	------------

---

## **II - 2 - Matériel**

### **II - 2 - 1 - Milieux**

- Milieu pour l'utilisation des glucides
- Milieu pour la recherche de la production de  $\text{SH}_2$
- Milieu pour la recherche de l'uréase
- Milieu pour la recherche des decarboxylases (ADH, ODC, LDC)
- Milieu au citrate de Simmons
- Milieu au malonate
- Milieu pour le test au rouge de méthyl (RM) et la réaction de Voges Proskauer (VP)
- Milieu pour la recherche de l'indole
- Milieu pour la recherche de la phénylalanine désaminase (PDA)
- Milieu pour la recherche de la nitrate réductase
- Milieu pour le test à l'ONPG
- Milieu BCP

### **II - 2 - 2- Galerie API**

Nous avons utilisé la galerie Api20E

### **II - 2 - 3 - Réactifs**

- Huile de paraffine
- KOH
- alpha naphthol
- acide sulfanilique
- alpha naphthylamine
- réactif de KOVACS
- perchlorure de fer
- rouge de méthyle

## II - 3 - Méthode

### II- 3 - 1 - Principe

La plaque est constituée de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés, destinés à la mise en évidence d'activités enzymatiques et de fermentation (ou oxydation) sucrées (**tableau VI**)

**TABLEAU VI : COMPOSITION DE LA GALERIE D'IDENTIFICATION**

TESTS	SUBSTRATS
GLU	GLUCOSE
MAN	MANNITOL
LAC	LACTOSE
INO	INOSITOL
SAC	SACCHAROSE
SOR	SORBITOL
NIT	NITRATE DE POTASSIUM
SH2	THIOSULFATE DE SODIUM
UREE	UREE
IND	TRYPTOPHANE
VP	GLUCOSE
RM	GLUCOSE
CS	CITRATE DE SODIUM
MAL	MALONATE
PDA	PHENYL ALANINE
ONPG	O. NITRO PHENYL Beta D. GALACTOPYRANOSIDE
ADH	ARGININE
ODC	ORNITHINE
LDC	LYSINE

### **II - 3 - 2 - Préparation de la plaque**

- Répartir dans chaque microtube 50 µl de milieu.
- Déshydrater les milieux à l'étuve (42°C) en présence de dessicateur (gomme arabique) pendant 18 heures.
- Recouvrir la plaque d'un film adhésif avant de mettre le couvercle.
- Mettre sous emballage avec un déshydratant.
- Conserver à 4°C ou -20°C.

### **II - 3 - 3 - Ensemencement**

- Répartir 100ml d'une suspension d'opacité correspondant au point 0,5 de l'échelle de Mac Farland.
- Recouvrir d'huile de paraffine les microtubes où sont recherchés les caractères biochimiques suivants :

- \* la fermentation des glucides
- \* la recherche de l'uréase
- \* la production de H<sub>2</sub>S
- \* la recherche des décarboxylases

### **II - 3 - 4 - Incubation**

24 heures à 37°C (étuve) sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau.

### **II - 3 - 5 - Lecture**

Notre méthode donne lieu à des réactions colorées, dont la lecture se fait à l'œil nu, éventuellement après addition d'un ou plusieurs réactif (s) (**tableau VII**)



**Tableau VII: TABLEAU DE LECTURE**

TESTS	REACTIFS A AJOUTER	INTERPRETATION DES REACTIONS	
		POSITIF	NEGATIF
GLU MAN LAC INO SA SOR		vert à jaune	bleu
NIT	1 goutte d'acide sulfanilique + 1 goutte d'alpha naphtylamine	Rouge	Incolore
SH2		Précipité noir	Incolore
UREE		rouge violacé	jaune
IND	1 goutte de réactif de KOVACS	Anneau rouge	Anneau jaune
VP	1 goutte de KOH puis 1 goutte d'alphanahtol Attendre 10 mn avant la lecture	Rouge	Incolore
RM	1 goutte de rouge de méthyl	Rouge	Jaune orangé
CS		Bleu	Vert
MAL		Bleu	Jaune vert
PDA	1 goutte de perchlorure de fer	Vert	Jaune
ONPG		Jaune	incolore
ADH		Violet	jaune
ODC		Violet	jaune
LDC		Violet	jaune

## **II - 3 - 6 - Paramètres d'évaluation.**

### **II - 3 - 6 - 1- Contrôle de qualité (3)**

Notre méthode est soumise à un contrôle de qualité par une méthode bactériologique normalisée.

Chaque lot de préparation de milieu est testé avec une souche sélectionnée pour sa sensibilité et sa spécificité (souche de référence).

Cette souche provient de l'Américain Type Culture Collection (ATCC) *E. coli* 35218

### **II - 3 - 6 - 2 - Reproductibilité.**

Elle est estimée en testant plusieurs fois la souche de référence avec les différents lots de préparation de milieu.

### **II - 3 - 6 - 3- Fiabilité**

Afin d'évaluer la performance de notre méthode, nous l'avons comparé aux galeries Api 20E.

Parmi les 102 souches entérobactéries, nous avons réidentifié 48 par galeries Api20E, afin de voir les concordances et les discordances éventuelles.

Nous avons enfin comparé les résultats obtenus par la galerie Api 20E avec ceux fournis par notre méthode.

### **II - 3 - 6 - 4- Stabilité**

Un lot de plaques est préparé et conservé à 4°C et -20°C chaque semaine, nous testons 2 plaques du lot pour apprécier la stabilité.

**II - 3 - 6 - 5- Rapidité du test.**

C'est la moyenne du temps de réalisation d'un test par des personnes différentes.

**II - 3 - 6 - 6- Coût.**

Le coût est évalué par la détermination de la valeur de tous les constituants des milieux. La plaque est exclue du prix.

## RESULTATS ET COMMENTAIRES

### I - IDENTIFICATION

Le tableau VIII présente les résultats de l'identification de 102 souches d'entérobactéries.:

89,3% des souches ont été correctement identifiées en genres et espèces.

0,9 % sont identifiées correctement avec les tests supplémentaires.

C'est une souche d'*Enterobacter aerogenes* où nous avons testé en plus la fermentation du rhamnose pour confirmer le genre.

9,8 % sont incorrectement identifiées.

Il s'agit :

- <i>C. amalonaticus</i>	1
- <i>E. aerogenes</i>	1
- <i>K. oxytoca</i>	3
- <i>M. morganii</i>	2
- <i>S. typhi</i>	2
- <i>Sh. sonnei</i>	1

**Tableau VIII** : Résultats de l'identification des 102 souches d'entérobactéries

Espèces	Nombre de souches identifiées		
	correctement	correctement avec des tests supplémentaires	incorrectement
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	0	1
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0	0
<i>Citrobacter malonaticus</i>	6	0	0
<i>Escherichia coli</i>	30	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	1	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	0	0
<i>Morganella morganii</i>	0	0	2
<i>Proteus mirabilis</i>	4	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0	0
<i>Salmonella typhi</i>	6	0	2
<i>Shigella boydii</i>	4	0	1
<i>Shigella dysenteriae A1</i>	5	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	5	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	5	0	0
<i>Shigella stuartii</i>	5	0	0
<i>Providencia rettgerii</i>	1	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>91</b>	<b>1</b>	<b>10</b>
<b>Pourcentage</b>	<b>89,3 %</b>	<b>0,9 %</b>	<b>9,8 %</b>

Nous avons ensuite exprimé le pourcentage de réactions positives des 102 souches testées (**tableau IX**)

**Tableau IX** : Pourcentage de réactions positives des 102 entérobactéries testées

	G L U	M A N	L A C	I N O	S A C	S O R	N I T	S H <sub>2</sub>	U R E E	I N D	V P	R M	C S	M A L	P D A	O N P G	A D H	O D C	L D C
<i>C. amalonaticus</i>	100	100	100	0	50	100	100	0	0	100	0	100	50	0	0	100	0	50	50
<i>C. freundii</i>	100	100	100	0	100	100	100	100	0	0	0	100	100	50	0	100	50	0	0
<i>C. malonaticus</i>	100	100	67	50	67	100	100	0	0	100	0	100	67	100	0	100	67	100	67
<i>E. aerogenes</i>	100	100	100	100	100	100	100	0	50	0	100	0	100	100	0	100	0	100	50
<i>E. cloacae</i>	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	100	0	100	100	0	100	100	100	0
<i>E. coli</i>	100	100	100	0	57	97	100	0	0	97	0	100	0	0	0	100	17	80	87
<i>K. oxytoca</i>	100	100	80	100	80	100	100	0	100	100	100	0	100	100	0	100	40	40	100
<i>K. pneumoniae</i>	100	100	100	100	100	100	100	0	90	0	100	0	100	100	0	100	10	0	100
<i>M. morganii</i>	100	100	0	100	50	100	100	0	100	100	0	100	0	50	100	0	0	100	100
<i>P. mirabilis</i>	100	0	0	0	25	0	100	100	100	0	0	100	50	0	100	0	0	75	0
<i>P. vulgaris</i>	100	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0	0	0	0
<i>P. rettgeri</i>	100	100	0	100	0	0	100	0	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0
<i>P. stuarti</i>	100	0	0	60	20	0	100	0	100	100	0	100	80	0	100	0	0	0	0
<i>S. typhi</i>	100	100	0	0	0	87	100	62	0	0	0	100	0	0	0	0	0	50	75
<i>Sh. sonnei</i>	100	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0	100	
<i>Sh. spp*</i>	100	67	0	20	4	20	100	0	0	7	0	100	0	0	0	0	0	0	0

\* *S. spp* = *S. dysenteriae A1*, *S. flexneri* et *S. boydii*.

## II - EVALUATION

48 entérobactéries parmi les 102, ont été testées par galerie Api20E ; leur répartition est fournie par le tableau X

**Tableau X : Echantillonnage des 48 souches d'entérobactéries testés par Api20E**

ENTEROBACTERIES	NBRE DE SOUCHES
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1
<i>Citrobacter freudii</i>	1
<i>Citrobacter malonaticus</i>	3
<i>Escherichia coli</i>	5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
<i>Morganella morganii</i>	1
<i>Proteus mirabilis</i>	4
<i>Proteus vulgairis</i>	1
<i>Providencia stuartii</i>	5
<i>Salmonella typhi</i>	5
<i>Shigella sonnei</i>	2
<i>Shigella boydii</i>	2
<i>Shigella dysenteriae A1</i>	3
<i>Shigella flexneri</i>	3
<i>Entérobacter cloacae</i>	4
<i>Entérobacter aerogenes</i>	2
<b>TOTAL</b>	<b>48</b>

Le tableau XI présente les résultats comparatifs de l'identification des 48 souches d'entérobactéries à l'aide de notre méthode et la galerie Api 20E.

Nous observons une concordance dans le diagnostic de genre et d'espèce pour près de 71% des souches.

Les discordances portant sur le diagnostic de genre ne sont pas observées.

Dans les discordances qui atteignent 29 %, nous avons fait figurer tous les autres cas :

◇ différences dans le diagnostic de genre bactérien (0%).

◇ différences dans le diagnostic d'espèce au sein d'un genre bactérien (6%).

◇ réponse de type :

- "profil douteux" (4 %) : c'est quand le profil présente au moins deux caractères inhabituels ; mais qui n'empêche pas de faire une identification.

- "profil inacceptable" (2 %) : c'est quand le profil obtenu ne permet pas de une identification.

- "discrimination insuffisante entre" (17%) : c'est quand le profil obtenu permet une identification correcte bien qu'il ait un caractère discordant avec la galerie Api 20E.



**Tableau XI : Résultats comparatifs de l'identification des 48 souches d'entérobactéries à l'aide de notre méthode et la galerie Api 20E.**

	CONCORDANCES	DISCORDANCES					Total
		Genre bactérien	Espèce bactérienne	"Profil douteux"	"Profil inacceptable"	"Discrimination insuffisante entre"	
Nombre de souches	34	0	3	2	1	8	48
%	71	0	6	4	2	17	100

Nous avons ensuite exprimé le pourcentage de concordance des caractères étudiés sur Api 20E et selon notre méthode pour chaque espèce.

## II-1 *Citrobacter*

Pourcentage de concordance des caractères étudiés sur Api 20E et selon notre méthode pour *Citrobacter*.

Aucune discordance n'a été observée pour *C. amalonaticus* etc. *C. freundii*. Par contre pour *C. malonaticus*, la concordance est de 67% pour l'ADH.

**Tableau XII : Pourcentage de concordance des caractères étudiés sur Api 20E et selon notre méthode pour *Citrobacter*.**

	<i>C. amalonaticus</i>	<i>C.freudii</i>	<i>C.malonaticus</i>
GLU	100	100	100
MAN	100	100	100
INO	100	100	100
SAC	100	100	100
SOR	100	100	100
SH2	100	100	100
UREE	100	100	100
IND	100	100	100
VP	100	100	100
CS	100	100	100
PDA	100	100	100
ONPG	100	100	100
ADH	100	100	67
ODC	100	100	100
LDC	100	100	100

## II-2 - *Escherichia coli*

Pour *Escherichia coli*, nous avons observé 60% de concordance pour l'ODC, 80% pour le saccharose et 100% pour les autres caractères.( **Tableau XIII**)

**Tableau XIII : Pourcentage de concordance des caractères étudiés sur Api 20E et selon notre méthode pour l'espèce *Escherichia coli***

[illegible]

### II -3 - Klebsiella

Pour *Klebsiella oxytoca*, nous avons 67% de concordance pour l'ADH, pas de concordance pour l'ODC et 100% de concordance pour les autres caractères.

Et pour *Klebsiella pneumoniae*, l'urée présente 67% de concordance et les autres caractères présentent 100% de concordance (**Tableau XIV**)

### II -4 - Morganella morganii

Aucune concordance n'a été observée pour les décarboxylases et le sorbitol . Et pour les autres caractères, nous avons 100% de concordance. (**Tableau XV**)

### II-5 - Proteus

Aucune discordance n'a été observée pour les Proteus (**Tableau XVI**).

### II- 6 - Providencia stuartii

Pour *Providencia stuartii*, nous avons une concordance de 80% pour l'inositol et 100% pour les autres caractères (**Tableau XVII**).

### II- 7 - Salmonella typhi

Pour *Salmonella typhi*, nous avons une concordance de 60% pour le SH<sub>2</sub>, 80% pour l'ODC et 100% pour les autres caractères (**Tableau XVIII**).

### II- 8 - Shigella

Aucune discordance n'a été observée pour *S.dysenteriae A1*, *S.flexneri* et *S. sonnei*. (**Tableau XIX**).

Et pour *Shigella boydii*, nous avons 50% de concordance aussi bien pour l'Inositol que pour le saccharose et 100% pour les autres caractères.

**Tableau XIV : Pourcentage de concordance des caractères étudiés sur Api 20E et selon notre méthode pour les souches de Klebsiella**

[illegible]

**Tableau XV : Pourcentage de concordance des caractères étudiés sur Api 20E et selon notre méthode pour l'espèce *Morganella morganii***

[illegible]

**Tableau XVI : Pourcentage de concordance des caractères étudiés sur Api 20E et selon notre méthode pour les souches de Proteus**

[illegible]

**Tableau XVII :** Pourcentage de concordance des caractères étudiés sur Api 20E et selon notre méthode pour l'espèce *Providencia stuartii*

[illegible]



**Tableau XVIII : Pourcentage de concordance des caractères étudiés sur Api 20E et selon notre méthode pour les souches de *Salmonella typhi***

[illegible]

**Tableau XIX : Pourcentage de concordance des caractères étudiés sur Api 20E et selon notre méthode pour les Shigelles**

[illegible]

## II -9 - Enterobacter

Nous n'avons pas de discordance pour *E. cloacae*.

Pour *E. aerogenes* nous avons 50% de concordance pour l'urée et la LDC et 100% pour les autres caractères

**Tableau XX : Pourcentage de concordance des caractères étudiés sur Api 20E et selon notre méthode pour les Enterobacter.**

	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>
GLU	100	100
MAN	100	100
INO	100	100
SAC	100	100
SOR	100	100
SH2	100	100
UREE	100	50
IND	100	100
VP	100	100
CS	100	100
PDA	100	100
ONPG	100	100
ADH	100	100
ODC	100	100
LDC	100	50

### III- PARAMETRES D'EVALUATION

#### III-1- Contrôle de qualité

Le profil biochimique obtenu avec la souche de référence est donné par le tableau XXI.

**Tableau XXI : Profil biochimique de *E. coli* ATCC 35218**

G L U	M A N	L A C	I N O	S A C	S O R	N I T	S H 2	U R E E	I N D	V P	R M	C S	M A L	P D A	O N P G	T	A D H	O D C	L D C
+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+

#### III-2- Reproductibilité

La souche de référence testée plusieurs fois avec le même lot ou de lots différents de milieu a donné les mêmes résultats.

#### III- 3- Fiabilité

Sur 48 souches d'entérobactéries, testées par Api 20E, nous avons 42 qui concordent sur le plan identification avec notre méthode.

#### III-4- Stabilité

Elle est d'environ 2 semaines à +4°C et plus d'un mois à -20°C

#### III-5- Rapidité

La moyenne du temps de réalisation d'un test est de 3 mn.

#### III-6- Coût

Le prix hors taxe d'un test est estimé à 21,7 francs CFA (la plaque exclue). **TABLEAU XXII**

**TABLEAU XXII : Evaluation en francs CFA du test.**

<b>TESTS</b>	<b>PRIX EN CFA DE 100 ml</b>	<b>PRIX EN CFA DE 50 ml</b>
<b>GLU</b>	1706,54	0,85327
<b>MAN</b>	574,74	0,28737
<b>LAC</b>	422,04	0,21102
<b>INO</b>	9857,54	4,92877
<b>SAC</b>	1017,14	0,50857
<b>SOR</b>	4997,54	2,4987
<b>CS</b>	50,59	0,025295
<b>MAL</b>	4347,9	2,174
<b>UREE</b>	1407,14	0,7036
<b>IND</b>	176,54	0,08827
<b>VP</b>	281,6	0,1408
<b>RM</b>	281,6	0,1408
<b>T</b>	46,9	0,02345
<b>ADH</b>	271,3	0,1356
<b>LDC</b>	6482,9	3,2414
<b>ODC</b>	3646,3	1,8234
<b>SH2</b>	50,15	0,025075
<b>NIT</b>	60,95	0,030475
<b>ONPG</b>	7560	3,78
<b>PDA</b>	200,64	0,10032
<b>TOTAL</b>	<b>43 440,05</b>	<b>21,720</b>

## DISCUSSION

### I- IDENTIFICATION

Nous avons étudié 102 souches d'entérobactéries :

- 89,3 % ont été bien identifiées.
- 0,9 % nécessitent des testes complémentaires pour leur identification
- 9,8 % n'ont pas été correctement identifiées

Une étude fait par **SCHRECKENBERGER et Coll. (43)** sur l'identification de 152 souches par le système RapID onE a donné des valeurs voisines :

- 92,1 % sont correctement identifiées.
- 1,3 % sont identifiées pour le genre bactérien
- 6,5 % sont mal identifiées

Ce système a été amélioré puis **KITCH T. et COLL. (26)** l'ont évalué sur 364 entérobactéries.

- 95,8 % des souches sont correctement identifiées
- 1,0 % des souches sont correctement identifiées avec des tests complémentaires
- 3,2 % sont incorrectement identifiées.

Les souches qui n'ont pas été bien identifiées par ces auteurs concernent surtout les entérobactéries du groupe KES et quelques espèces de Salmonella et de Citrobacter.

## II - EVALUATION

- Les identifications réalisées par notre méthode concordent dans environ 71% des cas avec les résultats de la galerie Api 20E prise comme référence.

Ces chiffres sont voisins de ceux rapportés dans la littérature par d'autres auteurs.

**REYNAUD A.E et Coll (36)** ont 80% de concordance dans une étude comparative de 97 souches d'entérobactéries à l'aide de galeries rapid 20E et Api 20E.

**HOLMES B. et coll (21, 30)** ont 77% de concordance dans l'évaluation de leur méthode d'identification sur 511 souches d'entérobactéries.

Une incubation plus prolongée jusqu'à 48heures améliore le pourcentage de concordance de notre méthode (76%).

Parmi les 29% de discordance, il faut noter que nous n'avons pas observé de discordances concernant le genre bactérien contrairement aux travaux de **REYNAUD A. E et coll** qui ont 1% de discordance majeure avec la galerie Api 20E.

○ Les discordances concernant le diagnostic d'espèce bactérienne sont observées avec trois souches de *Klebsiella oxytoca* qui sont identifiés par la galerie Api 20E comme *K.ornithinolytica*. **Monnet D. et coll (31, 42)** ont montré que la majeure partie des *K.oxytoca* isolés dans les laboratoires de microbiologie correspondait à des *K. ornithinolytica* d'où l'intérêt de la recherche des decarboxylases dans l'identification des enterobacteries **(18)**.

Ces discordances concernent le diagnostic d'espèce des entérobactéries du groupe KES ; ces genres bactériens font partie de ceux les plus fréquemment rencontrés dans les résultats discordants rapportés par d'autres auteurs **(10, 17, 21, 27)**.

○ Les "Profil douteux" représentent 4% des discordances ; sont observés avec deux souches.

\* une souche de *Salmonella typhi* qui est ODC<sup>+</sup> et SH<sub>2</sub><sup>-</sup> alors que habituellement, les *Salmonella typhi* sont ODC<sup>-</sup> et SH<sub>2</sub><sup>+</sup>

\* une souche *Shigella boydii* qui fermente l'inositol et le saccharose alors que habituellement les Shigelles ne fermentent pas ces deux sucres.

Ce "profil douteux" ont été décrit par **REYMOND A.E. (8%)** et **HOLMES B. (15%)**.

○ Les "profil inacceptable" représentent 2% et sont observés avec une souche de *Morganella morganii* qui n'a pu être identifié par notre méthode.

Cette espèce faisant partie des genres qui présentent souvent des résultats discordants.

**REYMOND A.E.** a eu 3% et **HOLMES BB.** 8%.

Ce type de profil nécessite le renouvellement du test.

○ Les réponses de type "Discrimination insuffisante entre" représentent 17%. Ce pourcentage est diminué par une incubation de 48 heures.

Au total parmi les 29% de discordances, celles liées à la recherche des décarboxylases représentent 58% d'où la nécessité d'améliorer cette recherche en utilisant comme indicateur de pH plus sensible et plus stable comme par exemple le rouge de phenol.

Les discordances liées à la production de SH<sub>2</sub> représentant 9% des discordances.

Elles sont généralement levées après une incubation de 48 heures.

Les discordances liées à la recherche de l'uréase (9%) sont aussi levées par une incubation plus longue ou un ensemencement dense de la souche bactérienne. Ces discordances sont observées avec les Klebsielles qui ont une activité uréasique faible.

18% des discordances sont liées à l'utilisation des glucides.



## **II- Avantages.de méthode.**

○ Elle permet la mise en oeuvre systématique d'un nombre de tests très supérieurs à celui d'une galerie classique en bactériologie de routine.

○ La méthode permet un gain de place par rapport aux méthodes classiques : elle diminue l'encombrement du laboratoire aussi bien en ce qui concerne la préparation et la stérilisation que les postes de travail (paillasse, étuve).

○ Elle a un coût moins élevé par rapport aux méthodes classiques et les galeries Api (1000 FCFA par test).

## **III- Inconvénients.**

○ La préparation nécessite une bonne maîtrise lors de dessiccation afin d'éviter l'altération des principes actifs et les souillures.

○ La stabilité des milieux déshydratés doit être améliorée.

○ La stérilisation des microplaques nécessite des appareils comme le four à micro-ondes.

## CONCLUSION

Les infections humaines à entérobactéries occupent une place importante en pathologie infectieuse en raison de leur fréquence et de leur gravité tant à l'hôpital que dans les populations.

La mise au point d'une microméthode permettant leur identification est d'un grand intérêt.

Notre méthode utilise une microplaque constituée de 20 cupules contenant des substrats déshydratés, destinés à la mise en évidence d'activités enzymatiques et de fermentation sucrées.

La suspension bactérienne répartie dans les cupules dissout les substrats. Les métabolites produits sont mis en évidence par des réactions colorées ou par addition de réactifs après 24 H d'incubation à 37°C.

102 souches d'entérobactéries ont été identifiées par notre méthode :

☒ 89,3% des espèces sont correctement identifiées

☒ 0,9% sont identifiées avec des tests complémentaires

☒ 9,8% sont mal identifiées et concernent surtout les espèces du genre : Klebsiella, Enterobacter, Salmonella Shigella, Morganella.

Afin d'évaluer la performance de la méthode, nous l'avons comparé avec la galerie Api20E prise comme référence.

48 souches ont été retestées et nous avons :

◆ 71 % de concordance dans le diagnostic du genre et d'espèce

◆ 29 % de discordance dont :

- . 58 % liées à la recherche des décarboxylases
- . 9 % liées à la production de SH<sub>2</sub>
- . 9 % liées à la recherche de l'urée
- . 18 % liées à la fermentation des sucres.

Cette méthode mise au point offre des avantages :

- Sécurité d'identification
- Gain de temps
- Gain de place
- Coût bas par rapport aux galeries habituelles

Dans le but d'élargir l'utilisation du test dans les autres structures de la place des améliorations seront apportées. Elles concernent surtout la stabilité, le temps d'incubation et le conditionnement.









Pourcentage de concordance des souches d'entérobacter



